

The development of an experimental model to assess mechanical performance of skeletal muscle in the intact mouse

Citation for published version (APA):

Gorselink, M. (2001). *The development of an experimental model to assess mechanical performance of skeletal muscle in the intact mouse*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20010628mg>

Document status and date:

Published: 01/01/2001

DOI:

[10.26481/dis.20010628mg](https://doi.org/10.26481/dis.20010628mg)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 10

SUMMARY

Summary of the thesis content.

10.1 - Summary

Skeletal muscle comprises about 40 % of the whole body mass, and plays an important role in locomotion. Animal models, like the rat and the mouse, are often used in studying muscular functioning and energy metabolism since experiments on these species are more easily to perform and to standardise compared to human studies on muscular functioning. Recently, the generation of transgenic and knockout mice has greatly enhanced the possibilities for studying the specific role of proteins and enzymes in energy metabolism and mechanical functioning of the skeletal muscle. Muscle contractile properties in mice, however, are mostly studied using invasive techniques, varying from single muscle fibre studies to whole muscle experiments. These invasive experimental procedures for studying skeletal muscle functioning in the mouse may, however, affect muscular function. Therefore, we wanted to investigate mechanical characteristics of skeletal muscle of the mouse under physiological conditions as much as possible.

Chapters 3 and 4 give a detailed description of the experimental model specifically developed for the assessment of the contractile properties under isometric as well as under dynamic conditions of the dorsal and plantar muscle complexes of the intact mouse. Isometric contractile performance of both muscle complexes can be assessed with the isometric mouse dynamometer (1) (*Chapter 3*). Using this measurement device, isometric muscle torque could be accurately measured within the range of $-14 \text{ mN}\cdot\text{m}$ and $+14 \text{ mN}\cdot\text{m}$. During the experiments, halothane anaesthetised Swiss wild-type mice were positioned on the thermostatic measurement platform, and fixated with a novel hip and foot fixation unit. Plantar or dorsal muscle complexes were electrically stimulated. For accurate measurements of muscle functioning in small animals, like mice, the following criteria are essential. First, stiff fixation of the animal to the measuring device is necessary to prevent displacement of bones. Any movements of bones due to loose fixation causes shortening of the muscle-tendon complex and, hence, influence the force generation. Second, the ankle axis should be aligned to the apparatus shaft as good as possible. In commonly used rigid knee fixation methods, this eccentricity will affect the measured muscle torque, because an additional fixation force will result in a non-muscle torque with a magnitude of the fixation force times the eccentricity distance. The novel fixation unit was evaluated by measuring knee and ankle displacements during contractions. The assessed ankle and knee displacement resulted in a calculated muscle fibre shortening of 2.5 %. The functional consequences of these hind limb movements were evaluated with a mathematical muscle model. Simulations of a contraction with this fibre shortening, using the mathematical muscle model showed only minor effects on maximal torque and the temporal parameters.

Furthermore, we showed that muscle torque in our set-up is hardly affected by eccentricity between ankle and measurement axis. Measured tetanic muscle torques of intact dorsal and plantar flexors amounted to 3.2 ± 0.4 mN·m and 11.8 ± 1.6 mN·m, respectively. The $\frac{1}{2}$ -relaxation time of plantar flexors was significantly higher than in dorsal flexors (14.9 ± 1.6 ms vs. 11.8 ± 2.0 ms).

Although the isometric dynamometer provides valuable information on muscle mechanical performance, it is not appropriate for determining contractile properties during shortening and lengthening contractions. Therefore, a mouse ergometer for assessment of shortening and lengthening contractile properties of intact plantar and dorsal flexors of the mouse has been described and evaluated (2) (*Chapter 4*). With the mouse ergometer, muscular torque ranging from -50 to 50 mN·m can be assessed. Evaluation of the fixation procedure of the animal to the set-up via 3-D monitoring of the muscle-tendon complex length showed that the additional shortening in length due to a contraction with maximal torque output exerts only minor effects on assessed torque. Furthermore, it was found that a misalignment between the axis of rotation of the set-up relative to the axis of rotation in the ankle joint, i.e., eccentricity, during a routine experiment was estimated to be less than 1.0 mm, and hence, did not influence the measured torque output in our experimental set-up. Peak power per unit muscle mass (mean \pm sd) of intact dorsal and plantar flexors amounted to 0.27 ± 0.02 W·g⁻¹ and 0.19 ± 0.03 W·g⁻¹, respectively. The angular velocity at maximal peak power generated by the dorsal flexor complex and the plantar flexor complex amounted to 1100 ± 190 °·s⁻¹ and 700 ± 90 °·s⁻¹, respectively.

In the present thesis, we also aimed to study the consequence of defects in energy metabolism on mechanical functioning of murine skeletal muscle. First, we studied the effect of disruption of the cytoplasmic and mitochondrial creatine kinase genes on muscular performance. Creatine kinase (CK) forms a small family of isoenzymes playing an important role in maintaining the concentration of ATP and ADP in muscle cells. To delineate the impact of lack of CK activity, we studied contractile performance during a single maximal tetanic contraction and during 12 repeated tetanic contractions of intact dorsal flexors of CK knockout mice (3) (*chapter 5*). To investigate the effect on ATP regeneration, muscular high-energy phosphate content was determined at rest, immediately after the contraction series and after a 60 seconds recovery period. Maximal torque of the dorsal flexors was significantly lower in CK^{-/-} mice than in wild type animals, i.e., 23.7 ± 5.1 and 33.3 ± 6.8 mN·m·g⁻¹ wet weight, respectively. Lower muscle ATP (20.1 ± 1.4 in CK^{-/-} vs. 28.0 ± 2.1 μ mol·g⁻¹ dry weight in controls) and higher IMP (1.2 ± 0.5 in CK^{-/-} vs. 0.3 ± 0.1 μ mol·g⁻¹ dry weight in controls) levels, at the onset of contraction, may contribute to the declined contractility in CK^{-/-} mice, but do not play a decisive role.

In contrast to wild type muscles, ATP levels could not be maintained during the series of 12 tetanic contractions of dorsal flexors of CK^{-/-} mice and dropped to $15.5 \pm 2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight. The significant increase in tissue IMP ($2.4 \pm 1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight) content following the contraction series indicates ATP regeneration through adenylate kinase, which activity is inherently not capable to fully compensate for the lack of CK. ATP regeneration via the adenylate kinase pathway is a likely cause of reduced basal adenine nucleotide levels in CK^{-/-} mice.

In chapter 5, we observed that during a series of 12 consecutive high-intensity contractions, CK deficient (CK^{-/-}) dorsal flexors could not maintain their ATP content at the pre-contraction level, and was accompanied with a substantial increase in inosine monophosphate (IMP). In chapter 6 it was, therefore, assumed that during a second series of contractions, CK^{-/-} muscles would further deplete their muscular ATP pool with a concomitant rise in tissue IMP, which would unfavourably affect mechanical performance. Our data, however, indicate that tissue ATP ($17.7 \pm 3.1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) did not further decline and IMP did not further increase (1.2 ± 0.4 , 2.4 ± 1.1 , and $2.5 \pm 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ for resting, end of first series and end of second series, respectively) during the second series of contractions in CK^{-/-} muscles. Moreover, the mechanical performance of CK^{-/-} dorsal flexors was comparable during the two contraction series. The fact that the IMP content did not further increase in combination with a stable ATP level during the second contraction series, strongly suggest that AMP produced by the catalytic action of adenylate kinase is not degraded to IMP, but may act as intracellular high-energy phosphate carrier between for instance, ATP produced in the glycolytic pathway and the site of ATP consumption, according to the theory of Zeleznikar and co-workers (4). Surprisingly, the decline in torque during the second contraction series of wild type muscles (-20.1 %) was more pronounced than during the first series (-12.3 %), which was accompanied with a substantial increase in IMP content (0.3 ± 0.1 , 0.2 ± 0.1 , and $2.6 \pm 2.1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ for resting, end of first series and end of second series, respectively). The latter findings indicate that AMP deaminase, in combination with the adenylate kinase pathway, is operational during the second, but not during the first series of contractions in wild type muscles.

GLUT4 plays a predominant role in glucose uptake during muscular contraction (5, 6). In the present study, we have investigated in mice whether disruption of the GLUT4 gene affects isometric and shortening contractile performance of the dorsal flexor muscle complex in situ (*chapter 8*). Moreover, we have explored the hypothesis that lack of GLUT4 enhances muscular fatigability. Isometric performance normalised per unit muscle mass during a single tetanic contraction did not differ between wild type and GLUT4^{-/-} mice.

Shortening contractions, however, revealed a significant 1.4 fold decrease in peak power per unit mass, most likely caused by the fibre type transition from fast-glycolytic fibres (IIB) to fast-oxidative fibres (IIA) in GLUT4^{-/-} dorsal flexors. Moreover, it can be concluded that GLUT4 is essential for glycogen formation in the dorsal flexor complex since basal glycogen level is substantially decreased in GLUT4 deficient mice. The decreased glycogen level in GLUT4^{-/-} dorsal flexors most likely contributes to increased fatigue susceptibility in GLUT4^{-/-} mice. The significant decrease in relative work output during the steady state phase indicates that energy supply through compensatory routes is not capable to fully compensate for the lack of GLUT4.

The thesis ends with a general discussion, summarising the major findings in the preceding chapters, with special reference to the assessment of muscular performance in the intact mouse. Moreover, future perspectives for the use of the newly developed experimental models are presented.

10.2 – References

1. Gorselink, M., Drost, M. R., Louw de, J., Willems, P. J. B., Rosielle, N., Janssen, J. D., and Van der Vusse, G. J. (2000) Accurate assessment of in situ isometric contractile properties of hind limb plantar and dorsal flexor muscle complex of intact mice. *Pflügers Arch.* 439, 665-670
2. Gorselink, M., Drost, M. R., Louw de, J., Willems, P. J. B., Dekkers, E. C. A., Janssen, J. D., and Vusse van der, G. J. In situ assessment of shortening and lengthening contraction properties of hind limb ankle flexors of intact mice. *Pflügers Arch.* in press
3. Steeghs, K., Benders, A., Oerlemans, F., Haan de, A., Heerschap, A., Ruitenbeek, W., Jost, C., Deursen van, J., Perryman, B., Pette, D., Bruckwilder, M., Koudijs, J., Jap, P., Veerkamp, J., and Wieringa, B. (1997) Altered Ca^{2+} responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Cell* 89, 93-103
4. Zeleznikar, R. J., Dzeja, P. P., and Goldberg, N. D. (1995) Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem* 270, 7311-7319
5. Brozinick, J. T., Yaspelkis, B. R., Wilson, C. M., and Grant, K. E. (1996) Glucose transport and GLUT4 protein distribution in skeletal muscle of GLUT4 transgenic mice. *Biochem. J.* 313, 133-140
6. Klip, A., Volchuk, A., He, L., and Tsakidiris, T. (1996) The glucose transporter of skeletal muscle. *Cell Dev. Biol.* 7, 229-237

Chapter 11

SAMENVATTING

Samenvatting van het proefschrift

11.1 - Samenvatting

Ongeveer 40% van de totale massa van het lichaam wordt ingenomen door de skeletspieren. Deze skeletspieren spelen met name een belangrijke rol bij het bewegen van de afzonderlijke deelsegmenten van het lichaam. Het functioneren van de skeletspieren wordt door vele facetten bepaald, zoals de mechanische eigenschappen, het energie metabolisme en de aansturing van de spieren. Om de skeletspier functie en het energie metabolisme van de skeletspier te bestuderen, wordt meestal gebruik gemaakt van proefdier modellen, zoals de rat en de muis. De reden hiervoor is dat experimenten met deze knaagdieren, vergeleken met de condities van de experimenten die bij de mens worden uitgevoerd, eenvoudiger zijn. Recent is de muis als dier experimenteel model nog aantrekkelijker geworden, omdat er de mogelijkheid bestaat om transgene en knock-out muismodellen te genereren. Deze muizen bieden de mogelijkheid om de rol van specifieke eiwitten en enzymen in het energie metabolisme en de contractiele eigenschappen van de skeletspier in detail te bestuderen. Mechanische karakteristieken van een spiercontractie van de muis worden momenteel met behulp van invasieve in vitro technieken bepaald. Deze experimentele condities kunnen de skeletspierfunctie echter negatief beïnvloeden. Het hoofddoel van dit project was daarom het ontwikkelen en evalueren van een meetmethode om de skeletspier functie van de muis in zijn natuurlijke omgeving te onderzoeken.

De hoofdstukken 3 en 4 geven een gedetailleerde beschrijving van het ontwikkelde model, dat de mogelijkheid biedt om de contractie eigenschappen van het kuitspiercomplex en het scheenbeenspiercomplex van de muis, onder zowel isometrische als dynamische omstandigheden, te bestuderen. De isometrische eigenschappen van beide spiercomplexen kunnen met behulp van de isometrische dynamometer in kaart gebracht worden (1) (*hoofdstuk 3*). Het isometrische spierkoppel kan met behulp van dit onderdeel van het experimentele model in het bereik van -14 mN·m en 14 mN·m bepaald worden. Tijdens een experiment wordt de muis met behulp van halothaan verdoofd, en via de heup en voet aan de meetapparatuur bevestigd. De beide spiercomplexen kunnen nu geactiveerd worden via elektrische stimulatie van de zenuwen, die de desbetreffende spiercomplexen innervieren. Om nauwkeurige functiemetingen aan de skeletspier van muizen uit te voeren, zijn de volgende criteria van essentieel belang. Ten eerste moet de muis aan de meetapparatuur gefixeerd worden, zodat bewegingen van de achterpoot voorkomen worden. Deze bewegingen zullen namelijk extra verkortingen van het spierpeescomplex opleveren, die de krachtopbouw verstoren. Daarnaast moeten de draaias van het enkelgewricht en de as van de meet apparatuur zoveel mogelijk in elkaars verlengde liggen.

Bij de meest gebruikte kniefixatie methodes is het praktisch niet te voorkomen dat er een afwijking optreedt tussen de draaias van het enkelgewricht en de as van de meetapparatuur (excentriciteit). Het gemeten spierkoppel wordt hierdoor verstoord omdat een extra niet-spierkoppel via het onderbeen op de meetas wordt overgedragen. De nieuw ontwikkelde fixatiemethode is geëvalueerd via metingen van de bewegingen van het knie- en enkelgewricht tijdens een maximale spiercontractie. Deze bewegingen leiden tot een geschatte spiervezel verkorting van ongeveer 2.5 %. De consequentie van deze extra verkorting zijn bepaald via een wiskundig spiermodel. Simulaties van een isometrische spiercontractie met deze extra vezelverkorting, resulteerde in minimale verschillen in maximaal koppel, snelheid van krachtopbouw en relaxatie vergeleken met een simulatie zonder deze extra verkorting. Uit deze simulaties is geconcludeerd dat de nieuw ontwikkelde fixatie procedure geschikt is om spiereigenschappen van de intacte muis tijdens isometrische contracties op betrouwbare manier te meten. Daarnaast blijkt dat een excentriciteit tussen het enkelgewricht en de as van de meetapparatuur in onze experimentele opstelling geen effect heeft op het isometrische spierkoppel. Het gemeten spierkoppels van de intacte scheenbeenspier- en kuitspiercomplexen waren respectievelijk $3,2 \pm 0,4$ mN·m en $11,8 \pm 1,6$ mN·m. De ½-relaxatie tijd van het kuitspier complex was significant hoger dan de ½-relaxatietijd van het scheenbeenspier complex ($14,9 \pm 1,6$ ms versus $11,8 \pm 2,0$ ms).

Alhoewel de isometrische eigenschappen van de beide spiercomplexen met de isometrische dynamometer bepaald kunnen worden, kunnen de karakteristieken van spiercontracties tijdens verkorting en verlenging van de spier met dit apparaat niet onderzocht worden. Daarom is het experimentele model uitgebreid met de muizenergometer. Hiermee kunnen de spier karakteristieken tijdens verkorting en verlenging bepaald worden (2) (*hoofdstuk 4*). Met behulp van de muizenergometer kunnen spierkoppels van verkortende en verlengende contracties in een bereik van -50 tot 50 mN·m bepaald worden. De fixatie van de muis aan de meetapparatuur is getest via het meten van veranderingen in de lengte van het spierpeescomplex tijdens een verkortende contractie van het kuitspier complex. De resultaten tonen aan dat het spierkoppel nauwkeurig gemeten kan worden, terwijl de snelheden van krachtopbouw en relaxatie minder nauwkeurig bepaald kunnen worden. De excentriciteit tussen de meetas en het enkelgewricht tijdens de experimenten zijn nooit groter dan 1,0 mm. Een excentriciteit van deze grootte heeft in onze experimentele set-up geen invloed op het gemeten spierkoppel.

Het maximale vermogen, genormaliseerd voor de spier massa, van het kuitspier- en scheenbeenspiercomplex was respectievelijk $0,27 \pm 0,02 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$ en $0,19 \pm 0,03 \text{ W} \cdot \text{g}^{-1}$. De hoeksnelheden behorende bij deze vermogens waren 1100 ± 190 en 700 ± 90 graden per seconde.

Een tweede doel van dit proefschrift was het bepalen van de effecten van afwijkingen in het energie metabolisme op het functioneren van de intacte skeletspier. Ten eerste hebben we het effect van creatine kinase deficiëntie ($\text{CK}^{-/-}$) op het functioneren van de spier bestudeerd. Er zijn verschillende isovormen van creatine kinase in de skeletspiercel aanwezig, die tezamen een belangrijke rol spelen in de regulatie van de cellulaire ATP en ADP concentraties. De effecten van CK deficiënties zijn in het scheenbeenspier complex bestudeerd tijdens een enkelvoudige maximale spiercontractie en tijdens een serie van 12 maximale contracties (*hoofdstuk 5*). De hoeveelheid energierijke fosfaten in rust, direct na 12 contracties en 60 seconden na de contractie serie zijn bepaald om de gevolgen van CK deficiëntie te bepalen op het ATP regenererende vermogen van de skeletspiercel tijdens deze vorm van inspanning. Het maximale koppel van het scheenbeenspiercomplex was significant lager in CK deficiënte muizen dan in normale muizen, namelijk $23,7 \pm 5,1$ versus $33,3 \pm 6,8 \text{ mN} \cdot \text{m}$ per gram nat spiergewicht. Een lager ATP ($20,1 \pm 1,4$ in $\text{CK}^{-/-}$ versus $28,0 \pm 2,1 \text{ } \mu\text{mol}$ per gram droog gewicht) en een hoger inosine monofosfaat (IMP) ($1,2 \pm 0,5$ in $\text{CK}^{-/-}$ versus $0,3 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{mol}$ per gram droog gewicht) gehalte in rust, zou kunnen bijdragen aan de daling van het maximale spierkoppel in $\text{CK}^{-/-}$ muizen. Uit de resultaten van hoofdstuk 6 blijkt echter dat deze biochemische veranderingen niet de hoofdoorzaak kunnen zijn van de verminderde mechanische output. De scheenbeenspieren van $\text{CK}^{-/-}$ muizen konden, in tegenstelling tot normale muizen, hun ATP niveau tijdens de contractieserie niet constant houden. Het ATP gehalte daalde tot $15,5 \pm 2,4 \text{ } \mu\text{mol}$ per gram droog gewicht. De toename in IMP ($2,4 \pm 1,1 \text{ } \mu\text{mol}$ per gram droog gewicht) tijdens de contractie serie duidt erop dat de ATP regeneratie via adenylaate kinase plaats vindt. Dit systeem was echter niet in staat om de afwezigheid van CK volledig te compenseren. De ATP regeneratie via het adenylaate kinase systeem resulteert daarnaast ook in een daling van het niveau van de adenine nucleotiden in CK deficiënte scheenbeenspieren.

Omdat we in hoofdstuk 5 hebben we laten zien dat tijdens een serie contracties van hoge intensiteit, de CK deficiënte muis niet in staat is zijn niveau van ATP te handhaven, terwijl het gehalte aan IMP significant toenam, hebben wij in hoofdstuk 6 verondersteld dat tijdens een tweede inspanningsserie het ATP gehalte verder zal dalen en het IMP gehalte verder zou stijgen. Deze biochemische veranderingen zouden het mechanisch functioneren van de skeletspier in CK deficiënte muizen negatief kunnen beïnvloeden.

De resultaten lieten echter zien dat het ATP ($17,7 \pm 3,1$ μmol per gram droog gewicht) en IMP gehalte ($1,2 \pm 0,4$, $2,4 \pm 1,1$ en $2,5 \pm 1,0$ μmol per gram droog gewicht tijdens respectievelijk rust, direct na de eerste contractieserie en direct na de tweede contractieserie) constant bleef tijdens de tweede contractieserie. Het mechanisch functioneren van de $\text{CK}^{-/-}$ spieren in de tweede contractieserie was vergelijkbaar met die tijdens de eerste contractieserie. Het feit dat het IMP gehalte niet verder steeg in combinatie met een stabiel ATP gehalte, duidt erop dat AMP, in plaats van substraat voor IMP vorming, dienst doet als transport mechanisme voor de energierijke fosfaten, wat in overeenstemming is met de theorie van Zeleznikar en collega's (3). Opvallend was dat in de scheenbeenspieren van normale muizen de daling in spierkoppel tijdens de tweede contractie serie sterker was dan in de eerste contractie serie. De sterkere daling van het spierkoppel tijdens de tweede contractie serie werd vergezeld van een stijging in het IMP gehalte ($0,3 \pm 0,1$, $0,2 \pm 0,1$ en $2,6 \pm 2,1$ μmol per gram droog gewicht tijdens respectievelijk rust, direct na de eerste contractie serie en direct na de tweede contractie serie). Deze bevindingen duiden erop dat in de scheenbeenspieren van normale muizen, het AMP deaminase in combinatie met adenylaat kinase wel actief is tijdens de tweede contractie serie maar niet gedurende de eerste contractie serie.

Tijdens spiercontractie speelt het GLUT4 eiwit een belangrijke rol in de opname van glucose in de spiercel (4, 5). In hoofdstuk 8 hebben we bestudeerd of muizen met een GLUT4 deficiëntie in de skeletspieren een afwijkend skeletspier functioneren hebben tijdens isometrische en verkortende contracties. Daarnaast hebben we in dit hoofdstuk de hypothese getoetst dat Glut4 deficiëntie de gevoeligheid voor vermoeidheid van de spieren doet toenemen. Het functioneren tijdens een isometrische contractie verschilt echter niet tussen scheenbeenspieren deficiënt in GLUT4 vergeleken met normale spieren. Het maximale vermogen tijdens verkortende contracties was significant gedaald in GLUT4 deficiënte scheenbeenspieren. Deze daling in maximaal vermogen wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een gedeeltelijke verschuiving in spiervezelsamenstelling, met name van snelle glycolytische vezels (IIB) naar snelle oxidatieve vezels (IIA). Uit het verminderde glycogeengehalte in GLUT4 deficiënte scheenbeenspiercomplexen in rust, kan geconcludeerd worden dat GLUT4 waarschijnlijk een essentiële rol speelt in de glycogeenvorming. Deze daling in glycogeen speelt waarschijnlijk een belangrijke rol in de toegenomen vatbaarheid voor vermoeidheid in de spieren deficiënt in GLUT4.

Mijn proefschrift eindigt met een algemene discussie, waarin de belangrijkste bevindingen kort worden samengevat. Hierbij is speciaal aandacht besteed aan het ontwikkelde model om skeletspierfunctie in intacte muizen te meten. Daarnaast is een korte beschouwing omtrent de mogelijke verbeteringen van het experimentele model gegeven en toekomstige toepassingsmogelijkheden toegelicht.

11.2 – Referenties

1. Gorselink, M., Drost, M. R., Louw de, J., Willems, P. J. B., Rosielle, N., Janssen, J. D., and Van der Vusse, G. J. (2000) Accurate assessment of in situ isometric contractile properties of hind limb plantar and dorsal flexor muscle complex of intact mice. *Pflügers Arch.* 439, 665-670
2. Gorselink, M., Drost, M. R., Louw de, J., Willems, P. J. B., Dekkers, E. C. A., Janssen, J. D., and Vusse van der, G. J. In situ assessment of shortening and lengthening contraction properties of hind limb ankle flexors of intact mice. *Pflügers Arch.* in press
3. Zeleznikar, R. J., Dzeja, P. P., and Goldberg, N. D. (1995) Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem* 270, 7311-7319
4. Brozinick, J. T., Yaspelkis, B. R., Wilson, C. M., and Grant, K. E. (1996) Glucose transport and GLUT4 protein distribution in skeletal muscle of GLUT4 transgenic mice. *Biochem. J.* 313, 133-140
5. Klip, A., Volchuk, A., He, L., and Tsakidiris, T. (1996) The glucose transporter of skeletal muscle. *Cell Dev. Biol.* 7, 229-237